

DERWENT- 1992-429278  
ACC-NO:

DERWENT- 200033  
WEEK:

COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Determining living body component using kit with improved dynamic range - using reagent contg. cyclodextrin(s), to assist dissolution of poorly water-soluble material or as stabiliser for unstable material

PATENT-ASSIGNEE: IATRON LAB INC[IATR]

PRIORITY-DATA: 1991JP-0121930 (April 25, 1991)

#### PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
JP 04326046 A	November 16, 1992	N/A	007	G01N 021/75
JP 3055036 B2	June 19, 2000	N/A	006	G01N 021/75

#### APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO	APPL-DATE
JP 04326046A	N/A	1991JP-0121930	April 25, 1991
JP 3055036B2	N/A	1991JP-0121930	April 25, 1991
JP 3055036B2	Previous Publ.	JP 4326046	N/A

INT-CL (IPC): C12Q001/00, C12Q001/48, G01N021/75, G01N033/50, G01N033/82

ABSTRACTED-PUB-NO: JP 04326046A

#### BASIC-ABSTRACT:

Determining living body component comprises using a reagent contg. cyclodextrins as agent for assisting the dissolution of water-hardly soluble substance or a stabiliser for unstable material and adding nonionic surfactant. Kit for determination of living body component consists of at least two reagents (A) and (B). (A) is reagent contg. cyclodextrins as the dissolution assisting agent or the stabiliser and (B) = a reagent contg. nonionic surfactant.

Cyclodextrins are pref. alpha-(or beta)-cyclodextrin or deriv. of alpha-(or beta)-cyclodextrin. Surfactant has straight chain alkyl or alkylphenyl at the hydrophobic part. Anionic surfactant used is e.g. Bridge 35 or Triton X. The surfactant is effective as a substance for accelerating the liberation of guest substance (e.g. substrate of enzyme e.g. phenyl-alanine, coenzyme e.g. NAD, dye e.g. fluorescein, inhibitor or chelating agent) from cyclodextrins used as inclusion material.

USE/ADVANTAGE - For determining living body component. By adding nonionic surfactant in the reaction system, liberation of guest material (water-hardly soluble substance or unstable substance) from cyclodextrins is easily carried out to form a substrate reaction soln. of high activity and then the effect of the substrate is effectively exhibited. Also as the depression of the initial absorbance of reagent or the change of colour tone owing to the addition of cyclodextrins to the reaction system is cancelled to increase effective concn. of guest material. Determin. sensitivity or accuracy and dynamic range are raised.

CHOSEN- Dwg.0/0  
DRAWING:

TITLE-TERMS: DETERMINE LIVE BODY COMPONENT KIT IMPROVE DYNAMIC RANGE REAGENT

CONTAIN CYCLODEXTRIN ASSIST DISSOLVE POOR WATER SOLUBLE MATERIAL  
STABILISED UNSTABLE MATERIAL

**ADDL-  
INDEXING-  
TERMS:**

NONIONIC

**DERWENT-CLASS:** B04 D16 S03

**CPI-CODES:** B04-B02C1; B04-C02B1; B04-C03C; B06-A03; B10-B02A; B11-C07B; B12-K04A; D05-H09;

**EPI-CODES:** S03-E04E; S03-E14H9;

**CHEMICAL-  
CODES:** Chemical Indexing M1 \*01\* Fragmentation Code M423 M430 M770 M782 M903 M904 M910  
N102 P831 Q233 V0 V722 Specific Compounds 01856D 01856M 04817D 04817M Registry  
Numbers 92407

Chemical Indexing M1 \*06\* Fragmentation Code G011 G012 G013 G100 H4 H401 H481 H5  
H541 H589 H8 M225 M226 M231 M240 M272 M281 M312 M323 M332 M342 M383 M393 M423  
M430 M510 M520 M530 M531 M540 M620 M782 M903 M904 N102 P831 Q616 V743 Markush  
Compounds 199252-23601-D 199252-23601-M Registry Numbers 92407

Chemical Indexing M2 \*02\* Fragmentation Code G010 G100 H1 H100 H181 J0 J011 J1 J171  
M280 M312 M321 M332 M343 M349 M371 M391 M414 M430 M510 M520 M531 M540 M770  
M782 M903 M904 M910 N102 P831 Q233 Specific Compounds 00243D 00243M Registry  
Numbers 92407

Chemical Indexing M2 \*03\* Fragmentation Code B615 B702 B713 B720 B797 B815 B832 D011  
D019 D931 F011 F012 F013 F014 F015 F019 F113 F199 F431 H1 H100 H122 H2 H201 H4  
H404 H424 H8 J0 J011 J3 J311 K0 L7 L721 L8 L812 L819 L821 L834 L9 L943 M280 M311 M322  
M342 M373 M392 M411 M430 M511 M523 M530 M540 M770 M782 M903 M904 M910 N102  
P831 Q233 V0 V762 V801 Specific Compounds 00075D 00075M Registry Numbers 92407

Chemical Indexing M2 \*04\* Fragmentation Code C108 D011 D022 D029 D210 G011 G100 H4  
H402 H442 H8 J0 J011 J1 J131 K0 L7 L730 M1 M113 M280 M320 M412 M430 M511 M520  
M531 M540 M770 M782 M903 M904 M910 N102 P831 Q233 Specific Compounds 01594D  
01594M Registry Numbers 92407

Chemical Indexing M6 \*05\* Fragmentation Code M903 P831 Q233 R515 R625 R627 Registry  
Numbers 92407

**UNLINKED-DERWENT-REGISTRY-NUMBERS:** ; 0075U ; 0243U ; 1594U ; 1856U

**SECONDARY-ACC-NO:**

**CPI Secondary Accession Numbers:** C1992-190758

**Non-CPI Secondary Accession Numbers:** N1992-327615

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平4-326046

(43)公開日 平成4年(1992)11月16日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 21/75	B	7235-2J		
C 1 2 Q 1/00	Z	6807-4B		
1/48	A	6807-4B		
G 0 1 N 33/82		7055-2J		

審査請求 未請求 請求項の数6(全 7 頁)

(21)出願番号 特願平3-121930

(22)出願日 平成3年(1991)4月25日

(71)出願人 000138277

株式会社ヤトロン

東京都千代田区東神田1丁目11番4号

(72)発明者 白川 義貴

東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株  
式会社ヤトロン内

(74)代理人 弁理士 今野 耕哉 (外1名)

(54)【発明の名称】 生体成分測定方法及び測定用試薬キット

(57)【要約】

【目的】 この発明は、水に難溶性の物質の溶解補助剤として、または不安定な物質の安定化剤として、シクロデキストリン類が使用されている試薬を用いて生体成分を測定するとき、水に難溶性の物質または不安定な物質(ゲスト)の、シクロデキストリン類からの遊離を促進するようにした生体成分測定方法及び生体成分測定用試薬キットに関するものである。

【構成】 測定系に、ブリッジ35、トリトンX等の非イオン性界面活性剤を共存させる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 水に難溶性の物質の溶解補助剤または不安定な物質の安定化剤として、シクロデキストリン類を含有する生体成分測定試薬を用いて生体成分を測定するに際し、測定系に非イオン系の界面活性剤を共存させることを特徴とする生体成分測定方法。

【請求項2】 シクロデキストリン類として、 $\alpha$ -シクロデキストリンまたは $\alpha$ -シクロデキストリンの誘導体を使用し、界面活性剤として、その疎水基部分に直鎖アルキルを有するものを使用する請求項1に記載する生体成分測定方法。

【請求項3】 シクロデキストリン類として、 $\beta$ -シクロデキストリンまたは $\beta$ -シクロデキストリンの誘導体を使用し、界面活性剤として、その疎水基部分にアルキルフェニル基を有するものを使用する請求項1に記載する生体成分測定方法。

【請求項4】 少なくとも、次の(A)及び(B)の2群の試薬から構成される生体成分測定用試薬キット。

(A) 水に難溶性の物質の溶解補助剤として、または不安定な物質の安定化剤としてシクロデキストリン類を含有する試薬

(B) 非イオン系の界面活性剤を含有する試薬

【請求項5】 シクロデキストリン類として、 $\alpha$ -シクロデキストリンまたは $\alpha$ -シクロデキストリンの誘導体を使用し、界面活性剤として、その疎水基部分に直鎖アルキルを有するものを使用する請求項4に記載する生体成分測定用試薬キット。

【請求項6】 シクロデキストリン類として、 $\beta$ -シクロデキストリンまたは $\beta$ -シクロデキストリンの誘導体を使用し、界面活性剤として、その疎水基部分にアルキルフェニル基を有するものを使用する請求項4に記載する生体成分測定用試薬キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】この発明は、生体成分測定方法及び生体成分測定用試薬キットに関するものである。更に詳しくは、水に難溶性の物質の溶解補助剤として、または不安定な物質の安定化剤として、シクロデキストリン（以下CDともいう）類が使用されている試薬を用いて生体成分を測定するとき、測定系に非イオン性界面活性剤を共存させることにより、前記水に難溶性の物質、または不安定な物質の水溶液中への遊離を促進するように工夫した生体成分測定方法及び生体成分測定用試薬キットに関するものである。

## 【0002】

【従来の技術と発明が解決しようとする課題】一般に酵素反応等の生化学的測定に用いる水系の生体成分測定試薬中には、酵素反応基質、補酵素、阻害剤、色素等の発色物質、防腐剤等の水に難溶性の物質あるいは不安定な物質を均一に溶解（含有）させる必要がある。これらの

水に難溶性の物質あるいは不安定な物質を高濃度に溶解させる試みは種々なされているが、完全な方法はなく、このため未だ生体成分測定試薬として利用できない、あるいは汎用されていない物質も存在する。また、これらの水に難溶性の物質は、通常生体成分測定試薬の調製時には巧妙な方法により可溶化されているが、経時的に結晶化、析出化、加水分解、酸化等が起こりやすく、一度結晶化または析出化が起こると、当該物質の濃度の低下を招き、精度の高い生体成分測定試薬としての機能を喪失してその価値を失ってしまう。

【0003】このような難溶性の物質を生体成分測定試薬中に溶解させ、また経時的な結晶化または析出化等を防止するための有力な方法の一つとして、従来から水に難溶性の物質とCD（またはCD誘導体）とを共存、またはその包接化合物として含有させる方法が公表されている（特開昭57-74099号は、特開昭60-160896号、特開昭61-260900号、特開昭63-129999号、特願昭63-144717号）。

【0004】これらの方法の中には、使用するCD自体の溶解度が小さ過ぎて、実際には難溶性の物質を高濃度に溶解させることができなかったり、CD誘導体が著しく高価過ぎて実際には全く実用化できないものも含まれているが、次のような共通の欠点が存在した。

(1) CD及びCD誘導体を使用して溶解度を向上させて測定系に導入された物質は、CDにより包接されているため、遊離の状態になり難く、その物質が反応（作用）しなければならない状況下で期待通りの充分な活性を示さない。すなわち、当該難溶性または不安定な物質を、CDの可溶化作用により測定系に計算量としては充分な濃度に含有させていても、CDの包接作用により実効濃度が実際には低下し、不足してしまう。

(2) CD類を色素物質の溶解度を高めるために使用したときには、色調を変化させる（吸収スペクトルを移動させる）場合があることが従来から知られている。この原因も測定系に導入された色素が、CDにより包接されているため、遊離の状態になり難いことから生ずることが多い。この色調の変化は、臨床検査試薬、あるいは一般的な分析試薬を使用する場合には、測定操作上好ましくない場合も多く、CDを利用する試薬において解決すべき課題であった。

【0005】さて、発明者は、以前特開平2-203797号公報において、測定系に脂肪酸を共存させ、当該難溶性または不安定な物質（ゲスト）の、CDからの遊離を促進させるようにした生体成分測定方法及び生体成分測定用試薬キットを公表した事実がある。このように脂肪酸を用いた場合は、アルカリ性下の反応系では分子量が比較的小さいので十分なモル濃度の試薬の調製ができ、目的の作用を十分に発揮させることができるが、酸性下での反応系では脂肪酸自体の溶解度が著しく減少してしまうので、ゲストの遊離促進物質として改良の余地が

あった。

【0006】そこで発明者は、更にゲストの遊離促進物質を鋭意検索した結果、非イオン界面活性剤がこの目的のために好適な物質であることを知り本発明を完成した。すなわち、非イオン界面活性剤を最終反応系に共存させれば、酸性、アルカリ性を問わず幅広いpH領域における反応系（試薬）において、ゲストの効果的な遊離促進物質として利用できることが判明した。

【0007】

【課題を解決するための手段】本願発明は、次の(1) 10 ~ (6)の請求項により構成されている。

(1) 水に難溶性の物質の溶解補助剤としてまたは不安定な物質の安定化剤として、シクロデキストリン類を含有する生体成分測定試薬を用いて生体成分を測定するに際し、測定系に非イオン系の界面活性剤を共存させることを特徴とする生体成分測定方法。

(2) シクロデキストリン類として、 $\alpha$ -シクロデキストリンまたは $\alpha$ -シクロデキストリンの誘導体を使用し、界面活性剤として、その疎水基部分に直鎖アルキルを有するものを使用する前記(1)に記載する生体成分 20 測定方法。

(3) シクロデキストリン類として、 $\beta$ -シクロデキストリンまたは $\beta$ -シクロデキストリンの誘導体を使用し、界面活性剤として、その疎水基部分にアルキルフェニル基を有するものを使用する前記(1)に記載する生体成分測定方法。

(4) 少なくとも、次の(A)及び(B)の2群の試薬から構成される生体成分測定用試薬キット。

(A) 水に難溶性の物質の溶解補助剤として、または不安定な物質の安定化剤としてシクロデキストリン類を含有する試薬 30

(B) 界面活性剤を含有する試薬

(5) シクロデキストリン類として、 $\alpha$ -シクロデキストリンまたは $\alpha$ -シクロデキストリン誘導体を使用し、界面活性剤として、その疎水基部分に直鎖アルキルを有するものを使用する前記(4)に記載する生体成分測定用試薬キット。

(6) シクロデキストリン類として、 $\beta$ -シクロデキストリンまたは $\beta$ -シクロデキストリン誘導体を使用し、界面活性剤として、その疎水基部分にアルキルフェニル基を有するものを使用する前記(4)に記載する生体成分測定用試薬キット。 40

【0008】本願発明においては、水に難溶性の物質、または不安定な物質を高濃度に水溶液として安定に存在させるときは、CDあるいはCD誘導体を用いて所望の試薬濃度を与えておくこととし、最終的な測定系あるいは反応系において非イオン性界面活性剤を共存させて、すでにCDにより包接体を形成しているゲスト分子と非イオン性界面活性剤分子を置換反応させ、ゲストがCD類から受けていた影響、例えば色調変化等の悪影響を解 50

消するとともに、ゲスト（本来の作用物質）の活量濃度を増加させ、より効果的な測定系、反応系を試薬の組み合わせにより実現するものである。

【0009】本願発明において、水に難溶性の物質、または不安定な物質とは、次の(イ)~(ハ)に記載する比較的低分子の有機化合物をいう。特に難溶性で不安定な酵素基質であるチロシン、トリプトファン、アデノシン、キサンチン、尿酸の使用に際しては、本願発明は極めて好適であり、更にニトロアニリン、ニトロフェノール類の各誘導体を検出することの特徴とする反応系においても、本発明の構成は極めて好適である。

(イ) 酵素反応の基質

(A) フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン等の難溶性アミノ酸

(B) アデニン、グアニン、チミン、シトシル、ウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、尿酸、イノシン等の水に難溶性の核酸塩基あるいはその代謝物

(C) チロキシ、アドレナリン、ノルアドレナリン、カテコールアミン、メラトニン等の低分子難溶性ホルモン 20

(D) テストステロン、アルドステロン、コルチコステロン、プロゲステロン、エストリオール等のステロイド系ホルモン

(ロ) 補酵素（ビタミン類）：ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、フラビンアデニンジヌクレオチド等のヌクレオチド系補酵素、ピリドキサルリン酸、ピオチン、葉酸、リボ酸、レチナール、カロチン、 $\alpha$ -トコフェロール、ビタミンK3、ユビキノ、ビタミンD等の非ヌクレオチド系補酵素

(ハ) 色素：

(A) フェノール、ヒドロキノン、カテコール、ピロガロール、パニリン等とその誘導体、

(B) ニトロアニリン、クロロニトロアニリンの酸アニリド誘導体、ニトロフェノール、クロロニトロフェノールのエステル結合誘導体またはエーテル結合誘導体

(C) フェノールフタレイン、アクリジン、フェナジン、フルオレセイン、ローダミン、ナフタレン、ピレン、アントラセン、ウンベリフェロン、クマリン誘導体とそれらにより標識されたハプテン

(二) 阻害剤：ジクマロール、ワルファリン、チオウラシル、2, 4-ジニトロフェノール、コルヒチン、p-クロロ安息香酸第二水銀等酵素あるいは代謝阻害物

(ホ) 防腐剤、抗生物質：チモール、クロラムフェニコール

(ヘ) その他：

(A) o-フェナントロリン、2, 2'-ジピリジル、バソクプロリン等のキレート剤

(B) トリグリセライド、コレステロール等の脂質

【0010】本願発明において、CD類とは、 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -CD等の未修飾CD、マルトシル化 $\alpha$ -、 $\beta$ -

5

α-CD、グルコシル化α-、β-CD等のいわゆる分岐CD誘導体、ヒドロキシプロピル-CD等の、水溶性向上のために側鎖を導入したCD誘導体をいう。

【0011】本願発明に使用する界面活性剤は、基本的にその親水基が非イオン性のポリオキシエチレン、ソルビトール等の糖アルコールやその誘導体等で構成され、疎水基が単素数4以上のアルキル基、またはアルキルフェニル基よりなり、両残基がエーテル結合またはエステル結合（両残基がリン酸を介したリン酸エステル結合したものでもよい）で共有結合した構造を有するものをいう。CD類にα-CDまたはその誘導体を用いた場合は、疎水基部分が直鎖アルキル基である非イオン性界面活性剤（例えばBr11シリーズ）を、CD類にβ-CDまたはその誘導体を用いた場合は、疎水基部分がアルキル基及び好ましくはアルキルフェニル基（例えばTriton-Xシリーズ）である非イオン界面活性剤を単独または組み合わせとして選ぶ。また、夫々複数の非イオン界面活性剤を使用しても良い。更に共存させる非イオン性界面活性剤の濃度、特に疎水基部分の分子濃度は、効果を発現させ得る量で十分であるが、非イオン性界面活性剤分子がCD類に包接されているゲスト分子と入れ替わる必要から、少なくともそのゲスト分子濃度よりも大きくするのが実際のところである。更に添加されているCD類の分子濃度を上回る程度に非イオン性界面活性剤の疎水基部分を添加すると、反応系にゲスト分子の殆どを遊離させることができるので、より好ましいことが多い。少なくともCD類の濃度或はゲスト分子の濃度のうち、より小さい分子濃度を示す方に比べて、非イオン性界面活性剤の添加濃度を大きくするのが望ましい。

【0012】本願発明を、生化学的分析項目として、γ-グルタミルトランスフェラーゼ（EC 2. 3. 2. 2、以下GTという）活性の測定系を例にとり説明すると次の通りである。γ-L-グルタミル-p-ニトロアニリド（γ-GpNA）を基質とする酵素活性γ-グルタミルトランスフェラーゼ（γ-GTP）の本基質に対するKm（ミカエリス-メンテン定数）は、約1mMであることが知られている。このKmの値から、γ-GTP活性を精度よく測定するためには、試薬中に含まれる基質の濃度は数mM以上が必要である。しかし、pH4～5以外のpHでは溶解度を比較的大きくすることができるが、加水分解速度が一段と大きくなるので、前記以外のpHでは試薬として保存することはできない。pH4～中性付近では、γ-GpNAの溶解度は最小で、2mM（4℃）未満しか溶解しないので実用に耐える試薬を調製し低温で保存するには、CD（この場合は、CD自体の溶解性を向上させた、例えばマルトシル化CD）を添加して溶解度を大きくする必要がある。ところが、前記CDを添加した基質溶液を使用するときは、次のような欠点がある。①酵素活性が期待された値より小さいこと。これは、活性の測定をしたい酵素自体の特性上の

6

問題点として酵素（GT）と基質との親和性が低いために、CD包接物から基質を奪うことができず、計算上は十分な濃度に基質が供給されているにも拘らず、酵素反応系には実質高濃度の基質が与えられていないという現象に起因する。この現象は、ミカエリス定数の大きな酵素とその基質を、その基質が難溶であるためにCDにより高濃度に水溶液として溶解した、そのことが実用系における矛盾として露呈したものである。②特にCD組成中にα-CDあるいはその誘導体を含むとき、試薬ブランクの吸光度が著しく高くなること。これは、ニトロ基を有しベンゼン環を有してなる色素分子、あるいはその誘導体がCDに包接されることにより、赤方向へスペクトルシフトを起こさせることから、測定の感度は向上するものの、大量の基質、すなわち色素誘導体を含む反応系の試薬ブランクの吸光度を増大させる現象に起因する。特に、α-CDあるいはその誘導体を含むCDを試薬に添加した場合が顕著である。そこで、反応系に非イオン性界面活性剤を共存させ、γ-GpNAをCD類から容易に遊離させることで、上述の問題点が一挙に解決され、極めて精度の高い測定が可能となる。

【0013】

【作用】本願発明においては、水に難溶性の物質、または不安定な物質を高濃度に水溶液として安定に存在させるときは、CDあるいはCD誘導体を用いて所望の試薬組成を与えておくこととし、最終的な測定系において非イオン系の界面活性剤を共存させて、ゲストと置換反応を行なわせ、ゲストがCDから受けていた影響、例えば色調変化等の悪影響を消滅させると共に、ゲストの実効濃度を増加させるものである。

【0014】

【実施例1】

<CD誘導体に対する界面活性剤の効果>\*CD誘導体に対する各種界面活性剤の効果を確かめるため、以下の試薬1及び試薬2を調製すると共に、下記の操作によりγ-GTPの活性値を求めた。

試薬1：80mMのグリシルグリシンを含む100mMトリス塩酸緩衝液中に、次の①～⑦に記載する非イオン性界面活性剤を一律25mM添加し、pHを8.3に調整したもの、及び二界面活性剤を含まないもの（無添加、対照）の合計9種（以下R1-Ⅱ、R1-①等と表す）。

①カプリル酸ナトリウム

②ブリッジ35（ポリオキシエチレン-n-アルキルエーテル）

③ツイーン20（ポリオキシエチレン・ソルビタン・モノラウレイト）

④ポリオキシエチレン（n=15）・ノニルフェニル・エーテル

⑤ポリオキシエチレン（n=20）・ノニルフェニル・エーテル

⑥トリトンX100 (Triton-X100 : ポリオキシエチレン (n≒10) - p-t-オクチルフェノール)

⑦トリトンX405 (Triton-X405 : ポリオキシエチレン (n≒40) - p-t-オクチルフェノール)

試薬2 : ①80mMのグルコシル- $\alpha$ -CD (G- $\alpha$ -CD) と、20mMの $\gamma$ -L-グルタミル-p-ニトロアニリド ( $\gamma$ -GpNA) 塩酸塩を含む基質溶液 (以下R2-①と表す)、②80mMのグルコシル- $\beta$ -CD (G- $\beta$ -CD) と、20mMの $\gamma$ -L-グルタミル-p-ニトロアニリド ( $\gamma$ -GpNA) 塩酸塩を含む基質溶液 (以下R2-②と表す)。

\*操作 : 市販管理血清 (標準法による $\gamma$ -GTP活性値が、47IU/Lのもの) 25 $\mu$ Lと、R1-②~R1-⑦の各1000 $\mu$ Lを夫々混合し、37℃で5分間加温後、R2-①、またはR2-②の、各250 $\mu$ Lを夫々加えて反応を開始する。反応開始後の波長405nmにおける吸光度変化を測定し、予め求めておいた反応生成物のp-ニトロアニリドの分子吸光係数から、夫々の試薬による血清中の $\gamma$ -GTP活性値を求める。

【0015】\*測定結果を表1 (巻末) に示す。なお、表中割合とは、標準法に対する比を表す (本法活性値/47IU)。また、活性値欄の括弧内は無添加の活性値を100としたときの比を表す。

【0016】表1の結果によれば、CDとして $\alpha$ 体を用いた場合、非イオン性界面活性剤として、疎水基部分に直鎖アルキルを有するものを使用するものが特に好適であり、またCDとして $\beta$ 体を用いた場合には、疎水基部分にアルキルフェニル基を有するものが特に優れていることが分かる。以上の結果は、マルトシル- $\alpha$ -CD及びマルトシル- $\beta$ -CDを使用して測定した結果も同様

であった。

【0017】

【実施例2】

<界面活性剤添加量の検討>\*以下の試薬 (R) を調製した。

R1-A : 80mMのグリシルグリシンを含む100mMトリス塩酸緩衝液 (pH8.3) にブリッジ35 (直鎖アルキルタイプ) を、0, 5, 10, 15, 20, 25, 30及び50mMの濃度となるように添加したもの。

R1-B : 80mMのグリシルグリシンを含む100mMトリス塩酸緩衝液 (pH8.3) にトリトンX-100 (アルキルフェニル基タイプ) を、0, 5, 10, 15, 20, 25, 30及び50mMの濃度となるように添加したもの。

R2-A : 80mMのグルコシル- $\alpha$ -CD (G- $\alpha$ -CD) と、20mMの $\gamma$ -L-グルタミル-p-ニトロアニリド ( $\gamma$ -GpNA) 塩酸塩を含む基質溶液。

R2-B : 80mMのグルコシル- $\beta$ -CD (G- $\beta$ -CD) と、20mMの $\gamma$ -L-グルタミル-p-ニトロアニリド ( $\gamma$ -GpNA) 塩酸塩を含む基質溶液。

\*操作 : 実施例1で用いた市販管理血清 (標準法による $\gamma$ -GTP活性値が47IU/Lのもの) 25 $\mu$ LとR1-Aの1000 $\mu$ Lを混合し、37℃で5分間加温後、R2-Aの250 $\mu$ Lを加えて反応を開始し、以下実施例1と同様の操作により $\gamma$ -GTP活性値を求めた。また、R1-B、及びR2-Bを使用して、前記操作と同様にして $\gamma$ -GTP活性値を求めた。

【0018】

\*測定結果を表2に示す。

表2

界面活性剤の量 (mM)	R1-A, R2-A 活性値 IU/L	R1-B, R2-B 活性値 IU/L
0 (0)	35.5	24.8
5 (4)	39.4	30.9
10 (8)	42.5	36.6
15 (12)	43.9	43.4
20 (16)	45.7	43.9
25 (20)	44.5	43.4
30 (24)	44.5	43.0
50 (40)	41.1	43.1

注1：表中括弧内は反応時の最終濃度であり、CDの反応時の最終濃度は16mMである。

【0019】表2の結果によれば、反応時に非イオン性界面活性剤が存在していれば、活性値は高くなる。好ましくは、CD濃度に合わせて、それに近い濃度の界面活性剤を共存させれば、CD添加によりデメリットを打ち消すことが可能となる。

【0020】

【発明の効果】本願発明は以上のように構成したから、従来CDおよびCD誘導体を使用し、難溶性の物質、ま

たは不安定な物質をゲストとして溶解度を向上させて測定系に導入し、これらの物質を反応させる際に、界面活性剤を共存せしめることによりそれまでのゲスト分子をCD類から容易に遊離させ、高い活量の基質・反応溶液がその場で形成できて、当該基質分子の作用を有効に発揮させることができ、また、試薬初期吸光度の抑制や測定系のCD類添加に由来する色調変化を相殺することができるので、感度やダイナミックレンジの向上および測定精度も向上させる効果を有する。

【表1】



界 面 活 性 剤	R2-① (G- $\alpha$ -CD)		R2-② (G- $\beta$ -CD)	
	割合%	活性値	割合%	活性値
R1-⑩ 対照	70	32.8	66	31.0
R1-① カプリル酸ナトリウム	92	43.2 (132)	73	34.5 (111)
R1-② ブリッジ35	95	44.5 (136)	74	35.0 (113)
R1-③ ツイーン20	91	42.9 (131)	77	36.3 (117)
R1-④ ポリオキシエチレン	70	33.1 (101)	87	41.0 (132)
R1-⑤ ポリオキシエチレン	71	33.6 (102)	85	40.1 (129)
R1-⑥ トリトンX100	74	34.1 (106)	92	43.4 (140)
R1-⑦ トリトンX405	69	32.5 (99)	92	43.4 (140)

注1：表中、割合とは、標準法に対する比を表す（本法活性値/47IU）。

注2：活性値欄の括弧内は無添加の活性値を100としたときの比を表す。

JAPANESE PATENT OFFICE  
PATENT JOURNAL (A)  
KOKAI PATENT APPLICATION NO. HEI 4[1992]-326046

Int. Cl. <sup>5</sup> :	G 01 N 21/75 C 12 Q 1/00 1/48 G 01 N 33/82
Sequence Nos. for Office Use:	7235-2J 6807-4B 6807-4B 7055-2J
Filing No.	Hei 3[1991]-121930
Filing Date:	April 25, 1991
Publication Date:	November 16, 1992
No. of Claims:	6 (Total of 7 pages)
Examination Request:	Not filed

LIVING BODY COMPONENT MEASURING METHOD AND THE MEASURING  
REAGENT KIT

[Seitai seibun sokutei hoho oyobi sokutei yo shiyaky kit]

Inventor:	Yoshitaka Shirakawa
Applicant:	000138277 Iatron Lab Inc.

Claims

1. A living body component measuring method, characterized by the fact that, during the measurement of a living body component by using a living body component measuring reagent containing a cyclodextrin as a dissolution auxiliary agent of a poorly soluble substance in water or as a stabilizing agent of an unstable substance, a nonionic surfactant is allowed to coexist in the measuring system.

2. The living body component measuring method described in Claim 1, in which  $\alpha$ -cyclodextrin or a derivative of  $\alpha$ -cyclodextrin is used as the cyclodextrin and a surfactant having a straight-chain alkyl [group] in the hydrophobic group portion is used as the surfactant.

3. The living body component measuring method described in Claim 1, in which  $\beta$ -cyclodextrin or a derivative of  $\beta$ -cyclodextrin is used as the cyclodextrin and a surfactant having an alkylphenyl group in the hydrophobic group portion is used as the surfactant.

4. A living body component measuring reagent kit constituted by at least reagents of the following two groups, (A) and (B):

(A) A reagent containing a cyclodextrin as a dissolution auxiliary agent of a poorly soluble substance in water or as a stabilizing agent of an unstable substance, and

(B) A reagent containing a nonionic type surfactant.

5. The living body component measuring reagent kit described in Claim 4, in which  $\alpha$ -cyclodextrin or a derivative of  $\alpha$ -cyclodextrin is used as the cyclodextrin and a surfactant having a straight-chain alkyl in the hydrophobic group portion is used as the surfactant.

6. The living body component measuring reagent kit described in Claim 4, in which  $\beta$ -cyclodextrin or a derivative of  $\beta$ -cyclodextrin is used as the cyclodextrin and a surfactant having an alkylphenyl group in the hydrophobic group portion is used as the surfactant.

#### Detailed explanation of the invention

[0001]

##### Industrial application field

The present invention relates to a living body component measuring method and a living body component measuring reagent kit. More specifically, it relates to a living body component measuring method and a living body component measuring reagent kit such that, during the measurement of a living body component by using a reagent utilizing a cyclodextrin (to be called CD hereafter) as a dissolution auxiliary agent of a poorly soluble substance in water or as a stabilizing agent of an unstable substance, by allowing a nonionic surfactant to coexist in the measuring system, the separation of the previously mentioned poorly soluble substance in water or the unstable substance into the aqueous solution is promoted.

[0002]

##### Prior art and problems to be solved by the invention

In general, it is required that an enzymatic reaction substrate, a coenzyme, an inhibitor, a coloring matter and other color-forming substances, a preservative and other poorly soluble substances in water or unstable substances are uniformly dissolved (contained) in a water-based living body component measuring reagent using an enzymatic reaction or other biochemical

measurements. A variety of attempts have been made to dissolve these poorly soluble substances in water or unstable substances to high concentrations. However, there has been no flawless method obtained. Therefore, they cannot be utilized yet as living body component measuring reagents, or substances not commonly used are also present. Furthermore, these poorly soluble substances in water can be solubilized by a skillful method during the preparation of a conventional living body component-measuring reagent. However, temporal crystallization, deposition, hydrolysis, oxidation or the like occurs easily. Once crystallization or deposition occurs, it will lead to a decrease in the concentration of said substance. The function as a living body component-measuring reagent with a high accuracy will be lost and its value will disappear.

[0003]

As one of the powerful methods for the dissolution of such a poorly soluble substance in a living body component measuring reagent or for the prevention of the temporal crystallization, deposition or the like, conventionally, a method allowing the coexistence of the poorly soluble substance in water and CD (or a CD derivative) or containing it as its clathrate compound has been published (Japanese Kokai Patent Application Nos. Sho 57[1982]-74099, Sho 60[1985]-160896, Sho 61[1986]-260900, Sho 63[1988]-129999 and Sho 63[1988]-144717).

[0004]

Among these methods, the solubility of the CD itself is too low and the poorly soluble substance cannot be dissolved in a high concentration in practice, or the CD derivative is markedly too expensive and is impractical. The following common disadvantages exist:

(1) Since the substance introduced into the measuring system to improve the solubility by using the CD and the CD derivative is clathrated by the CD, it is not entirely in a free state. In the state in which the substance has to be reacted, the expected sufficient activity is not exhibited. In other words, even if said poorly soluble or unstable substance is contained to a sufficient concentration as the calculated amount in the measuring system by the solubilizing effect of the CD, the effective concentration is, in fact, decreased by the clathration effect of the CD and is insufficient.

(2) It has been known conventionally that, when a CD is used in order to increase the solubility of a coloring matter, there are cases in which the hue is changed (the absorption spectrum is shifted). There are many cases in which this also occurs owing to the fact that it is difficult to achieve a free state since the coloring matter introduced into the measuring system is clathrated by the CD. This hue change is often undesirable in the measuring operation in the case

of using a clinical inspection reagent or a common analytical reagent. This has been a problem which needs to be solved for the reagent utilizing the CD.

[0005]

The present inventor has published a living body component measuring method and a living body component measuring reagent kit such that a fatty acid is allowed to coexist in the measuring system and the separation of said poorly soluble or unstable substance (guest) from the CD is promoted, in Japanese Kokai Patent Application No. Hei 2[1990]-203797. In the case of using a fatty acid in such a manner, the molecular weight is relatively small in the reaction system under alkaline conditions, a reagent of a sufficient molar concentration can be prepared and the desired effect can be exhibited sufficiently. However, under acidic conditions, the solubility of the fatty acid itself in the reaction system is decreased markedly. There has been room for improvement in the separation-promoting substance for the guest.

[0006]

Here, as a result of further zealous investigations on the separation-promoting substance of the guest, the present inventor has discovered that a nonionic surfactant is a substance appropriate for this objective. In other words, it has been found that, if a nonionic surfactant is allowed to coexist in the final reaction system, this can be utilized as an effective separation-promoting substance of the guest in a reaction system (the reagent) in a wide pH range irrespective of acidity or alkalinity.

[0007]

Means to solve the problems

The present invention is to be constituted by the following claims (1) - (6).

(1) A living body component measuring method, characterized by the fact that, during the measurement of a living body component by using a living body component measuring reagent containing a cyclodextrin as a dissolution auxiliary agent of a poorly soluble substance in water or as a stabilizing agent of an unstable substance, a nonionic surfactant is allowed to coexist in the measuring system.

(2) The living body component measuring method described in (1), in which  $\alpha$ -cyclodextrin or a derivative of  $\alpha$ -cyclodextrin is used as the cyclodextrin and a surfactant having a straight-chain alkyl in the hydrophobic group portion is used as the surfactant.

(3) The living body component measuring method described in (1), in which  $\beta$ -cyclodextrin or a derivative of  $\beta$ -cyclodextrin is used as the cyclodextrin and a surfactant having an alkylphenyl group in the hydrophobic group portion is used as the surfactant.

(4) A living body component measuring reagent kit constituted by at least reagents of the following two groups, (A) and (B):

(A) A reagent containing a cyclodextrin as a dissolution auxiliary agent of a poorly soluble substance in water or as a stabilizing agent of an unstable substance, and

(B) A reagent containing a nonionic type surfactant.

(5) The living body component measuring reagent kit described in (4), in which  $\alpha$ -cyclodextrin or a derivative of  $\alpha$ -cyclodextrin is used as the cyclodextrin and a surfactant having a straight-chain alkyl in the hydrophobic group portion is used as the surfactant.

(6) The living body component measuring reagent kit described in (4), in which  $\beta$ -cyclodextrin or a derivative of  $\beta$ -cyclodextrin is used as the cyclodextrin and a surfactant having an alkylphenyl group in the hydrophobic group portion is used as the surfactant.

[0008]

In the present invention, when a poorly soluble substance in water or an unstable substance is to be allowed to exist in a stable manner as an aqueous solution at a high concentration, a desired reagent concentration is rendered by using a CD or a CD derivative, a nonionic surfactant is allowed to coexist in the final measuring system or reaction system, the guest molecules forming a clathrate by the CD and the nonionic surfactant molecules are subjected to a substitution reaction, the effect rendered to the guest from the CD, such as the adverse effect of the hue change or the like, is eliminated, and the active concentration of the guest (the original acting substance) is increased. A more effective measuring system or reaction system can be achieved by combination of the reagents.

[0009]

In the present invention, the poorly soluble substances in water or unstable substances refer to organic compounds of relatively low molecules described in (I) - (VI) in the following. In particular, during the use of tyrosine, tryptophan, adenosine, xanthine, and urea as poorly soluble, unstable enzyme substrates, the present invention is extremely appropriate. Furthermore, in reaction systems characterized by the fact that a variety of derivatives of nitroaniline and nitrophenols are to be detected, the constitution of the present invention is also extremely appropriate.

(I) Substrates of enzymatic reactions

(A) Phenylalanine, tyrosine, tryptophan and other poorly soluble amino acids

(B) Adenine, guanine, thymine, cytosine, uracil, hypoxanthine, xanthine, uric acid, inosine or other nucleic acid bases or their metabolism products poorly soluble in water

(C) Thyroxine, adrenalin, noradrenalin, catecholamine, melatonin or other low-molecular, poorly soluble hormones

(D) Testosterone, aldosterone, corticosterone, progesterone, estriol or other steroid type hormones

(II) Coenzymes (vitamins): Nicotinamide adenine dinucleotide, flavin adenine dinucleotide or other nucleotide type coenzymes, pyridoxal phosphate, biotin, folic acid, lipoic acid, retinal, carotene,  $\alpha$ -tocopherol, vitamin K3, ubiquinone, vitamin D and other non-nucleotide type coenzymes

(III) Coloring matters:

(A) Phenol, hydroquinone, catechol, pyrogallol, vanillin and their derivatives

(B) Acid anilide derivatives of nitroaniline or chloronitroaniline, ester bonding derivatives or ether bonding derivatives of nitrophenol or chloronitrophenol

(C) Phenolphthalein, acridine, phenazine, fluorescein, rhodamine, naphthalene, pyrene, anthracene, umbelliferone, coumarin derivatives and hapten labels them

(IV) Inhibiting agents: Dicumarol, warfarin, thiouracil, 2,4-dinitrophenol, colchicine [transliteration], mercuric p-chlorobenzoate or other enzymes or metabolism inhibitors

(V) Preservatives and antibiotics: Thymol and chloramphenicol

(VI) Others:

(A) o-Phenanthroline, 2,2-dipyridyl, bathocuproin and other chelating agents

(B) Triglyceride, cholesterol or other lipids

[0010]

In the present invention, the CDs refer to  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -CD and other unmodified CDs, maltosylated  $\alpha$ - and  $\beta$ -CD, glucosylated  $\alpha$ - and  $\beta$ -CD and other so-called branched CD derivatives, hydroxypropyl-CD and other CD derivatives with the introduction of side chains in order to improve water solubility.

[0011]

The surfactant for use in the present invention refers to a substance having a structure such that basically its hydrophilic group is constituted by nonionic polyoxyethylene, sorbitol or other saccharide alcohols or their derivatives or the like, its hydrophobic group is an alkyl group

with 4 or more carbon atoms or an alkylphenyl group, and the two residual groups have a covalent bonding with an ether bond or an ester bond (or a phosphoric acid ester bond via phosphoric acid for the two residual groups). In the case of using  $\alpha$ -CD or its derivatives as the CD, a nonionic surfactant (for example, a Brij series) with the hydrophobic group portion being a straight-chain alkyl group is selected alone or in combination. In the case of using  $\beta$ -CD or its derivatives as the CD, a nonionic surfactant with the hydrophobic group portion being an alkyl group and preferably an alkylphenyl group (for example, a Triton-X series) is selected alone or in combination. Furthermore, multiple nonionic surfactants can also be used. Moreover, the concentration of the coexisting nonionic surfactant, in particular, the molecular concentration of the hydrophobic group portion, is sufficient at an amount to achieve effectiveness. However, since it is necessary to replace the nonionic surfactant molecules with the guest molecules clathrated in the CD, it is practical that they are at least larger than the guest molar concentration. Furthermore, if the hydrophobic group portion of the nonionic surfactant be added to an extent above the molar concentration of the CD added, virtually all guest molecules in the reaction system can be freed and this is preferable in many cases. It is desirable that the addition concentration of the nonionic surfactant is increased at least in comparison to the side showing a smaller molar concentration among the concentration of the CD and the concentration of the guest molecules.

[0012]

The present invention will be explained in the following manner by using the case of a measuring system for the activity of  $\gamma$ -glutamyl transferase (EC 2.3.2.2, to be called GT hereafter) as a biochemical analytical item. It is known that the  $K_m$  (Michaelis-Menten constant) with respect to the substrate for the enzymatically active  $\gamma$ -glutamyl transferase ( $\gamma$ -GTP) using  $\gamma$ -L-glutamyl-p-nitroanilide ( $\gamma$ -GpNA) as the substrate is about 1 mM. In order to measure the  $\gamma$ -GTP activity with high accuracy from the value of this  $K_m$ , it is necessary that the concentration of the substrate contained in the reagent be more than a few mM. At a pH other than pH 4-5, the solubility can be increased relatively. However, since the hydrolysis rate is increased, it is impossible to preserve this as a reagent at a pH other than that mentioned previously. At a pH from 4 to the vicinity of neutrality, the solubility of  $\gamma$ -GpNA is the minimum and only less than 2 mM (4°C) can be dissolved. In the preparation of a reagent for practical use and preservation at a low temperature, it is necessary to add the CD (in this case, for example, maltosylated CD with an increase in the solubility itself) to increase the solubility. However, when the substrate solution with the addition of the CD mentioned previously is used, there are following disadvantages: (1) Enzymatic activity is lower than what is expected. This is caused by a phenomenon in which the substrate cannot be deprived from the CD clathrate because the



affinity between the enzyme (GT) and the substrate as a problem in the characteristics of the enzyme itself for which the activity is to be determined, and a substrate of an essentially high concentration is not rendered in the enzymatic reaction system in spite of the fact that a substrate at a concentration sufficient in calculation is supplied. This phenomenon shows, as a paradox in the practical system, that the enzyme with a large Michaelis constant and its substrate are to be dissolved as an aqueous solution at a high concentration by the CD because the substrate is poorly soluble. (2) In particular, when  $\alpha$ -CD or its derivative is contained in the CD composition, the absorbance of the reagent blank is increased markedly. This is caused by the increase in the absorbance of the reagent blank of the reaction system containing a large amount of the substrate, that is, the coloring matter derivative in spite of an improvement in the sensitivity of measurement owing to the occurrence of the spectral shift in the red direction due to the fact that the coloring matter molecules having nitro groups and having benzene rings or their derivatives are clathrated by the CD. This is especially pronounced in the case of the addition of the CD containing  $\alpha$ -CD or its derivative into the reagent. Here, by allowing the coexistence of the nonionic surfactant in the reaction system and readily freeing  $\gamma$ -GpNA from the CD, the problems described previously can all be solved and a measurement of an extremely high accuracy is made possible.

[0013]

#### Operation

In the present invention, when a poorly soluble substance in water or an unstable substance is allowed to exist in a stable manner as an aqueous solution at a high concentration, the CD or its derivative is used to render a desired reagent composition. In the final measuring system, a nonionic type surfactant is allowed to coexist to conduct the substitution reaction with the guest. The effects received by the guest from the CD, for example, the hue change or other adverse effects, are eliminated. At the same time, the effective concentration of the guest is increased.

[0014]

#### Application Example 1

<Effects of the surfactants with respect to the CD derivatives>\*

In order to confirm the effects of a variety of surfactants with respect to the CD derivatives, the following reagents 1 and 2 were prepared. At the same time, the activity values of the  $\gamma$ -GTP were determined.

Reagent 1: In a 100mM trishydrochloric acid buffer solution containing 80 mM glycyl glycine, the nonionic surfactants described in (1)-(7) in the following were all added at 25 mM.

A total of nine types (to be denoted hereafter as R1=, R1-(1) and so on) having the pH adjusted to 8.3 and containing surfactants were prepared.

- (1) Sodium caprylate
- (2) Bri 35 (polyoxyethylene-n-alkyl ether)
- (3) Tween 20 (polyoxyethylene sorbitan monolaurate)
- (4) Polyoxyethylene (n = 15) nonyl phenyl ether
- (5) Polyoxyethylene (n = 20) nonyl phenyl ether
- (6) Triton-X100: Polyoxyethylene (n  $\approx$  10)-p-t-octylphenol
- (7) Triton-X405: Polyoxyethylene (n  $\approx$  40)-p-t-octylphenol

Reagent 2: (1) A substrate solution (to be denoted as R2-(1) hereafter) containing 80 mM glucosyl- $\alpha$ -CD (G- $\alpha$ -CD) and 20 mM  $\gamma$ -L-glutamyl-p-nitroanilide ( $\gamma$ -GpNA) hydrochloride, and (2) a substrate solution (to be denoted as R2-(2) hereafter) containing 80 mM glucosyl- $\beta$ -CD (G- $\beta$ -CD) and 20 mM  $\gamma$ -L-glutamyl-p-nitroanilide ( $\gamma$ -GpNA) hydrochloride

\*Operation: 25  $\mu$ L of the commercially available serum (a substance with the  $\gamma$ -GTP activity value of 47 IU/L by the standard method) and 1000  $\mu$ L of each of R1= to R1-(7) were mixed. After heating at 37°C for 5 min, 250  $\mu$ L of R2-(1) or R2-(2) were added to initiate the reaction. The absorbance change at the wavelength of 405 nm after the reaction initiation was measured. From the molecular absorbance coefficient of p-nitroanilide of the reaction product determined beforehand, the  $\gamma$ -GTP activity value in the serum in each of the reagent was determined.

[0015]

\* The measured results are shown in Table 1 (at the end of the document). The ratio in the table represents the ratio with respect to the standard method (the activity value of the present method/47 IU). Furthermore, the figure inside the parentheses of the activity value column represents its ratio when the activity value was 100 for no addition.

[0016]

According to the results in Table 1, in the case of using the  $\alpha$  body as the CD, the material using the substance having a straight-chain alkyl in the hydrophobic group portion as a nonionic surfactant is especially appropriate. Furthermore, it has been found that, in the case of using the  $\beta$  body as the CD, the material using the substance having an alkylphenyl group in the hydrophobic group portion is especially excellent. These results were the same as the results obtained by measurements using maltosylated  $\alpha$ -CD and maltosylated  $\beta$ -CD.

[0017]

Application Example 2

<Investigations on amounts of addition of surfactants> \*

The following reagents (R) were prepared.

R1-A: This was obtained by the addition of Brij 35 (a straight-chain alkyl type) to 100mM trishydrochloric acid buffer solution (pH 8.3) containing 80 mM glycyl glycine so that the concentrations were 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 and 50 mM.

R1-B: This was obtained by the addition of Triton X-100 (an alkylphenyl group type) to 100mM trishydrochloric acid buffer solution (pH 8.3) containing 80 mM glycyl glycine so that the concentrations were 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 and 50 mM.

R2-A: A substrate solution containing 80 mM glucosyl- $\alpha$ -CD (G- $\alpha$ -CD) and 20 mM  $\gamma$ -L-glutamyl-p-nitroanilide ( $\gamma$ -GpNA) hydrochloride

R2-B: A substrate solution containing 80 mM glucosyl- $\beta$ -CD (G- $\beta$ -CD) and 20 mM  $\gamma$ -L-glutamyl-p-nitroanilide ( $\gamma$ -GpNA) hydrochloride

\*Operation: 25  $\mu$ L of the commercially available serum (a substance with the  $\gamma$ -GTP activity value of 47 IU/L by the standard method) used in Application Example 1 and 1000  $\mu$ L of R1-A were mixed. After heating at 37°C for 5 min, 250  $\mu$ L of R2-A were added to initiate the reaction. Then the  $\gamma$ -GTP activity value was determined by the same operation as in Application Example 1. Furthermore, by using R1-B and R2-B, the  $\gamma$ -GTP activity values were determined in the same manner as the operation described previously.

[0018]

The measured results are shown in Table 2.

Table 2

① 界面活性剤の量 (mM)	R1-A, R2-A 活性値 IU/L ②	R1-B, R2-B 活性値 IU/L ③
0 (0)	35.5	24.8
5 (4)	39.4	30.9
10 (8)	42.5	36.6
15 (12)	43.9	43.4
20 (16)	45.7	43.9
25 (20)	44.5	43.4
30 (24)	44.5	43.0
50 (40)	41.1	43.1

Key: 1 Amount of the surfactant (mM)  
 2 R1-A, R2-A Activity value IU/L  
 3 R1-B, R2-B Activity value IU/L

Footnote 1: The figure number the parentheses in the table is the final concentration during the reaction. The final concentration during the reaction of the CD was 16 mM.

[0019]

According to the results of Table 2, the activity value is increased if a nonionic surfactant is allowed to be present during the reaction. Preferably, in combination with the CD concentration, if a surfactant at a concentration similar to it is allowed to coexist, the disadvantage due to the CD addition is negated.

[0020]

Effect of the invention

Since the present invention is constituted in the manner described previously, the conventional CD and the CD derivative are used and the poorly soluble substance or the unstable substance as the guest is introduced into the measuring system to improve the solubility. During the reaction of these substances, by allowing the coexistence of a surfactant, the guest molecules can be easily liberated from the CD. A high-activity substrate-reaction solution can be formed in situ and the action of said substrate molecules can be exhibited effectively. Furthermore, since the inhibition of the reagent's initial absorbance and the hue change derived from the CD

addition into the measuring system can cancel each other, out there are effects in the improvement of sensitivity and the dynamic range and the improvement in the measurement accuracy.

Table 1

① 界面活性剤	R2-① (G- $\alpha$ -CD)		R2-② (G- $\beta$ -CD)	
	割合% <sup>②</sup>	活性値 <sup>③</sup>	割合% <sup>②</sup>	活性値 <sup>③</sup>
R1-④ 対照 <sup>④</sup>	70	39.8	66	31.0
R1-⑤ カプリル酸ナトリウム <sup>⑤</sup>	92	43.2 (132)	73	34.5 (111)
R1-⑥ ブリッジ35 <sup>⑥</sup>	95	44.5 (136)	74	35.0 (113)
R1-⑦ ツイーン20 <sup>⑦</sup>	91	42.9 (131)	77	36.3 (117)
R1-⑧ ポリオキシエチレン <sup>⑧</sup>	70	38.1 (101)	87	41.0 (132)
R1-⑨ ポリオキシエチレン <sup>⑨</sup>	71	38.6 (102)	85	40.1 (129)
R1-⑩ トリトンX100 <sup>⑩</sup>	74	34.1 (106)	92	43.4 (140)
R1-⑪ トリトンX405 <sup>⑪</sup>	69	32.5 (99)	92	43.4 (140)

- Key: 1 Surfactant  
 2 Ratio%  
 3 Activity value  
 4 Control  
 5 Sodium caprylate  
 6 Brij 35  
 7 Tween 20  
 8 Polyoxyethylene  
 9 Triton X100  
 10 Triton X405

Footnote 1: The ratio in the table represents the ratio with respect to the standard method (the activity value of the present method/47 IU).

Footnote 2: The figure inside the parentheses of the activity value column represents its ratio when the activity value was 100 for no addition.